

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-043188

(43)Date of publication of application : 14.02.1997

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

(21)Application number : 07-193708

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 28.07.1995

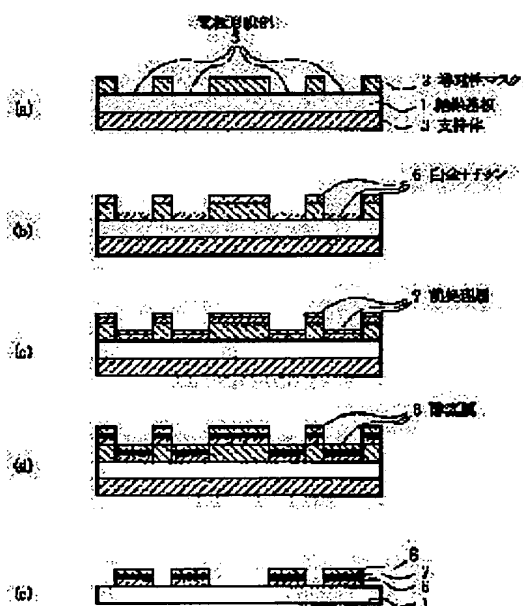
(72)Inventor : FURUSAWA MASAKO

## (54) METHOD FOR MANUFACTURING ENZYME ELECTRODE

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for manufacturing a reliable current detection type enzyme electrode with uniform characteristics in a mass since the pretreated state of the electrode is uniform.

SOLUTION: A conductive mask 2 is installed on an insulation substrate 1 and an electrode is formed. In that state, the entire substrate is dipped into an electrolyte, a potential is applied to each electrode and the electrolyte via the conductive mask 2 and the electrode surface is pretreated, and a treatment is made by silane coupling agent. Then, a solution obtained by mixing such base as albumin, enzyme, and a crosslinking agent is applied to form an immobilization enzyme film. Then, by releasing the conductive mask 2, an enzyme electrode where an enzyme film 8 is formed on each platinum electrode can be formed. Finally, by separating each electrode from the substrate 1, a large amount of current detection type enzyme electrodes with uniform characteristics can be manufactured.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.07.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2737710

[Date of registration] 16.01.1998

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2737710号✓

(45) 発行日 平成10年(1998) 4 月 8 日

(24) 登録日 平成10年(1998) 1 月 16 日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 J

3 5 3 Z

請求項の数 7 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-193708

(22) 出願日 平成7年(1995) 7 月 28 日

(65) 公開番号 特開平9-43188

(43) 公開日 平成9年(1997) 2 月 14 日

審査請求日 平成7年(1995) 7 月 28 日

(73) 特許権者 000004237

日本電気株式会社

東京都港区芝五丁目7番1号

(72) 発明者 古澤 真抄子

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気  
株式会社内

(74) 代理人 弁理士 京本 直樹 (外2名)

審査官 山村 祥子

(56) 参考文献 特開 平5-281181 (J P, A)

特公 平5-45910 (J P, B 2)

(54) 【発明の名称】 酵素電極の製造方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属基体上に酵素を固定化して構成される酵素電極の製造方法において、絶縁基板上に複数の電極形成部を有する導電性マスクを密着して設置し電極材となる金属を堆積する工程と、前記導電性マスクを介して導通した前記絶縁基板表面上の電極材に電解液中にて電解処理を施す工程と、前記電極材表面にシランカップリング剤を塗布する工程と、架橋剤を含む酵素溶液を塗布し固定化酵素膜を形成する工程と、最後に前記絶縁基板表面から導電性マスクを剥離する工程とを有することを特徴とする酵素電極の製造方法。

【請求項2】 前記導電性マスクと絶縁基板の密着方法として、支持体と導電性マスクの間に絶縁基板を挟み込み、留め具で固定することを特徴とする請求項1記載の酵素電極の製造方法。

2

【請求項3】 前記導電性マスクの構造として、上部に位置する金属補強材と下部に位置する導電性マスクとから構成されることを特徴とする請求項2記載の酵素電極の製造方法。

【請求項4】 前記支持体の材質として、磁石を用いることを特徴とする請求項2記載の酵素電極の製造方法。

【請求項5】 前記シランカップリング剤処理前の電解処理として、前記電極に参照極に対して水の電気分解によって酸素が発生する負側の電位と、水素が発生する正側の電位の間を少なくとも1回以上反復して印加することを特徴とする請求項1記載の酵素電極の製造方法。

【請求項6】 前記電解処理を施す場合の電位の印加方法として、前記の正側、負側の電位間を方形波、矩形波、三角波、サイン波の形状で掃引することを特徴とする請求項5記載の酵素電極の製造方法。

## 3

【請求項7】 前記電解処理を施す場合の電位の印加方法として、印加する負側の電位と正側の電位を異なる値にすることを特徴とする請求項5記載の酵素電極の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は各種液体成分の定量を行う酵素電極に関し、特に酵素を固定化した電流検出型酵素電極の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】優れた分子識別機能を有する酵素と、その応答を電気信号に変換するトランスデューサーとを組み合わせた酵素電極は、化学物質の選択性、応答速度、感度などが優れており、環境モニタリング、工業プロセス計測、臨床検査など広範囲な分野への応用が試みられている。近年、半導体製造工程を用いることにより微小な酵素電極の開発が可能となった。半導体製造工程を用いた電流検出型酵素電極の従来の製造方法を説明する。まず、図11(a), (b)に示すように石英などの絶縁基板1上に各電極の形状をネガ型にパターニングした金属などからなる導電性マスク2を設置し、支持体19によって挟み込み密着して固定する。この導電性マスク表面に白金などの電極材をスパッタ法により堆積して多数の電極を一括して形成する。その後絶縁基板上から導電性マスクを取り除き、電極を切り離してから個々の電極についてそれぞれ前処理および酵素膜形成を行う。

【0003】前処理工程については、特公平5-45910で白金基体に対する方法が報告されている。図12に示すように電解液21である0.05~0.5M程度の希硫酸中で、白金基体22に銀/塩化銀電極23に対して+1.0~+1.5Vの直流電位を印加し、30秒以上保つことにより白金基体22表面に水酸基(-OH)が導入される。次に、この白金基体22をアミノ基を有するシランカップリング剤溶液に浸漬すると、白金とシランカップリング剤の間で「Pt-O-Si」結合が形成される。さらにグルタルアルデヒド等の架橋剤で処理し、水洗した後、グルコースオキシダーゼ等の酵素溶液に浸漬して固定化酵素膜を形成する。上記の方法を用いれば電極表面上に直接固定化酵素膜を強固に固定化することができるため、長期にわたり安定した測定が行える酵素電極が製造できるとされている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このような従来の方法では前処理工程での電解処理を1つの電極ごとに行わねばならないため大量生産には向いていない。また電極の製造工程と前処理工程、酵素膜形成工程がそれぞれ独立して行われているため、個々の電極の前処理状態が均一にならず電極上へ固定化酵素膜の架橋強度にばらつきが生じていた。本発明の目的は、特性の均一な電流検出型酵素電極を大量に生産することを可能に

## 4

する製造方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、金属基体上に酵素を固定化する酵素電極の製造方法において、絶縁基板上に複数の電極形成部を有する導電性マスクを密着して設置し、電極材となる金属を堆積した後、前記導電性マスクを介して導通した前記絶縁基板全面に電解液中にてシランカップリング剤処理前の電解処理を施す工程と、前記基板上にシランカップリング剤を塗布する工程と、酵素膜を形成する工程を絶縁基板を分断することなく一貫して行うことを特徴としている。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明について図面を参照して詳細に説明する。図1(a), (b)は本発明の第1の実施の形態を示す平面図および断面図である。また図2(a)~(e)は本発明の第1の実施の形態による酵素電極の製造工程のフローを示した断面図である。図1及び図2(a)に示すように、下から支持体3、石英などの絶縁基板1、各電極を形成する部分が開口した電極形成部5を設けた導電性マスク2の順にそれぞれを密着して設置し、ネジなどの留め具4で動かないよう固定する。導電性マスク2は例えばステンレス製で厚さ0.1mmのものを用いる。その後電極材であるチタンと白金を順次スパッタ法により堆積して電極形成部5に白金電極を形成する。この状態を図2(b)に示す。チタン層の厚さは例えば0.1μm、白金層の厚さは0.3μmである。このため導電性マスクは非常に薄くしても良いので容易にリフトオフでパターン化できるが、固定の際の圧力で変形しやすいため図10に示すように導電性マスク2に補強材18を接着して用いるとマスクの変形がなくなりさらに基板との密着性が向上する。なお電極形成には蒸着法あるいは厚膜印刷法を用いて他の電極材を使ってもよい。

【0007】本発明では、こうして形成された白金電極を基板状態のまま電解処理および酵素膜形成を行うことに特徴がある。即ち、まず図2(b)で示す状態の基板の表面を70%の硝酸溶液で洗浄し付着物を除去した後、図3で示すようにリード線が接続された金属製のクリップなどで基板のオリエンテーションフラット部等を挟み、電解液9である0.1Mの硫酸ナトリウム溶液が入った電解槽10中に基板1と参照極12である銀/塩化銀電極および対極11である白金電極を浸漬し、室温(約23℃)中で図5に示すように対銀/塩化銀電極-1.5~+1.5Vの電圧範囲で掃引を行い電解処理すると、導電性マスク2を介して基板1全面と電解液9中に電位を印加することが可能となり、基板表面全体に一定量の水酸基を有する酸化被膜を均一に形成することができ、また同時に薬品洗浄などでは取り除けない電極表面の吸着物を電気化学的に除去することができる。掃引のサイクルは、1回の掃引につき12秒間で約20回以

## 5

上行うことが好ましい。特に基板表面が汚れている場合は100回以上の掃引が必要である。印加する電位は銀／塩化銀電極に対して、白金表面で水の電気分解が発生する電位である。また電極形成部5に形成された白金電極と導電性マスクを完全に導通させるためには、電解処理時に留め具をゆるめて導電性マスクを若干ずらしてもよい。

【0008】このような前処理を行った基板に、シランカップリング剤であるγ-アミノプロピルトリエトキシシラン（γ-APTES）溶液をスピン塗布し基板上にアミノ基を導入する。この状態を図2（c）に示す。そしてグルタルアルデヒドなどの架橋剤とたんぱく質で基剤となるウシ血清アルブミンおよびグルコースオキシダーゼなどの酵素の混合溶液を前処理層7形成後の絶縁基板表面にスピン塗布すると、基板の前処理状態が均一なため図2（d）に示すように架橋強度が均一な固定化酵素膜8が形成される。最後に留め具をはずし導電性マスク2および支持体を絶縁基板1から剥離すれば、図2

（e）に示すように酵素膜のパターニングも同時に実行することが可能となり、絶縁基板1から個々の電極を切り離すことにより大量の酵素電極が製造できる。従って、本発明による工程を採用することにより、基板上に白金電極を形成する工程と前処理のため電極に電位を印加する工程と酵素膜を形成する工程が順次基板状態で実行可能となり、特性の揃った電流検出型酵素電極が大量に生産できる。

【0009】また、基板状態で電解処理を行う方法としては、絶縁基板1に上記第1の実施の形態と同様な方法で導電性マスクを設置し白金をスパッタ法により堆積させるが、図4に示すように導電性マスクに電極同士を接続する共通配線13と共通入力端子14を形成するための開口部を設け電極15形成と同時に前記基板上に形成する。その後導電性マスクを基板上から剥離し、図3に示すように基板状態で第1の実施の形態と同じ条件で共通入力端子14から電位の印加を行い共通配線13を通して電極15表面の電解処理を行う。この方法においても第1の実施の形態と同様に基板上の電極全てに同時に電位を印加することができるため、個々の電極の前処理状態を均一に揃えることができる。

【0010】本発明における絶縁基板と導電性マスクの密着方法のその他の実施の形態を図8（a）、（b）および図9（a）、（b）に示す。図8では支持体の材質として磁石を用いることによって、導電性マスクの固定に留め具が不用となり操作性の改善が図れる。また図9ではネジではなくクリップ状の留め具を用い、側面を挟み込む様にして導電性マスク2と支持体3の間に絶縁基板1を固定する。

【0011】本発明における絶縁基板の電解処理方法の他の実施の形態を図6に示す。シランカップリング剤処理前の金属基体に電解処理を施す場合の電位の印加方法

## 6

としては図6に示すように方形波、サイン波などを印加している。これらの方法は第1の実施の形態の方法と同等な効果が得られる他、特に高精度の安定化された装置を必要とせず簡単な装置で処理が実現できるため、低コストで大量生産方法としては有効である。またプラスとマイナスの印加時間比は同じである必要はない。

【0012】本発明における絶縁基板の電解処理方法のその他の実施の形態を図7に示す。図6に示した実施の形態と同様に電解処理における電圧印加を方形波、矩形波、三角波、サイン波などをで行うが、この時+2.0〜-1.0Vの様に印加電圧をアンバランスにすることにより、電極表面はクリーニングよりも酸化が多くなり、より高品質の前処理層が形成できる。なお、プラスとマイナスの印加時間比は同じである必要はない。

## 【0013】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、絶縁基板上に複数の電極形成部を有する導電性マスクを密着して設置し、電極材となる金属を堆積した後、導電性マスクを介して導通した電解液中にて絶縁基板全面にシランカップリング剤処理前の電解処理を施す工程と、基板上にシランカップリング剤を塗布する工程と、酵素膜を形成する工程を絶縁基板を分断することなく一貫して行うことができる。このため、酵素電極の電極が極めて品質の良い面にクリーニングされると同時に固定化される酵素の密着性が向上し、安定した電流検出型酵素電極が大量に生産できる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】（a）、（b）は本発明による酵素電極の製造方法の一例の平面図および断面図である。

【図2】（a）～（e）は本発明による酵素電極製造工程の一例のフローを示した断面図である。

【図3】本発明による電極の電解処理の一例の構成図である。

【図4】本発明による酵素電極製造方法の他の例の平面図である。

【図5】本発明による電解処理における印加電圧の経時変化の一例を示す図である。

【図6】本発明による電解処理における印加電圧の経時変化の他の例を示す図である。

【図7】本発明による電解処理における印加電圧の経時変化のさらに他の例を示す図である。

【図8】（a）、（b）は本発明による導電性マスクの固定化方法の他の一例の平面図および断面図である。

【図9】（a）、（b）は本発明による導電性マスクの固定化方法のさらに他の例の平面図および断面図である。

【図10】本発明による導電性マスクの構造の一例の断面図である。

【図11】（a）、（b）は従来の酵素電極の製造方法

7

8

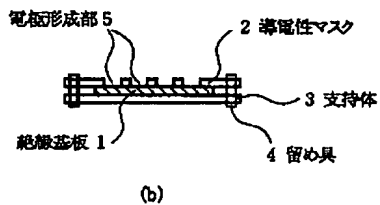
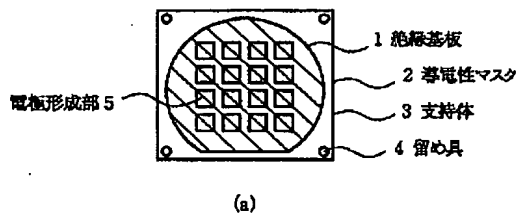
の一例の平面図および断面図である。

【図12】従来の電極の電解処理の一例の構成図である。

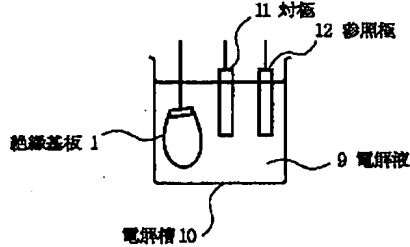
【符号の説明】

- |           |          |       |         |
|-----------|----------|-------|---------|
| 1         | 絶縁基板     | 9, 21 | 電解液     |
| 2         | 導電性マスク   | 10    | 電解槽     |
| 3, 19     | 支持体      | 11    | 対極      |
| 4, 17, 20 | 留め具      | 12    | 参照極     |
| 5         | 電極形成部    | 13    | 共通配線    |
| 6         | 白金(+チタン) | 14    | 共通入力端子  |
| 7         | 前処理層     | 15    | 電極      |
| 8         | 酵素膜      | 16    | 磁石      |
|           |          | 18    | 補強材     |
|           |          | 10 22 | 白金基体    |
|           |          | 23    | 銀/塩化銀電極 |

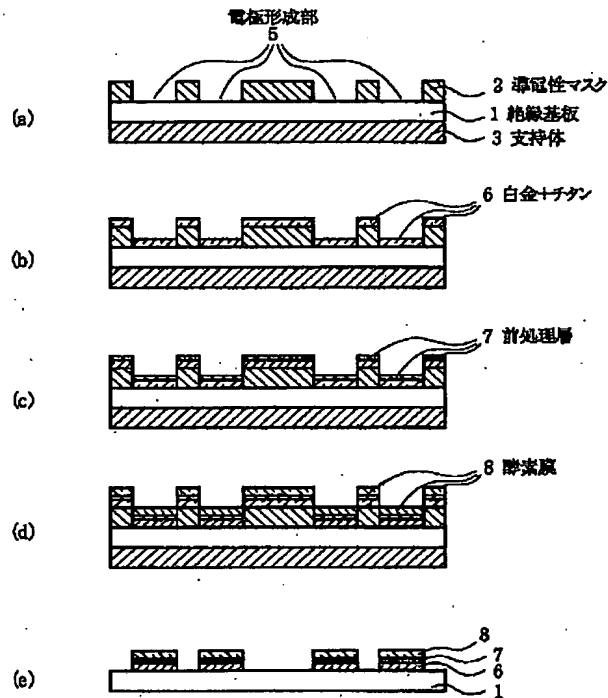
【図1】



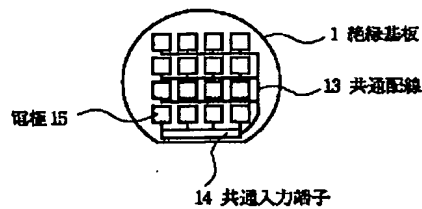
【図3】



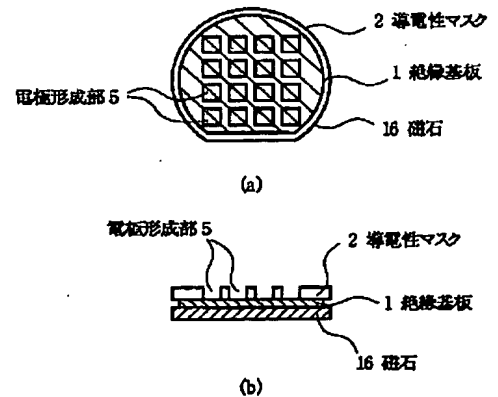
【図2】



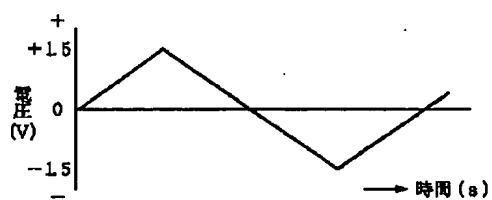
【図4】



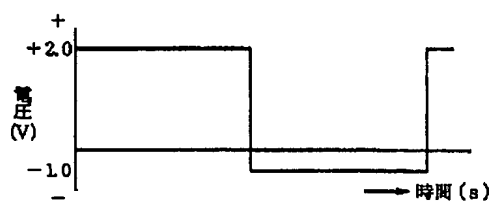
【図8】



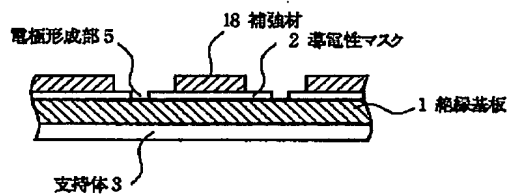
【図5】



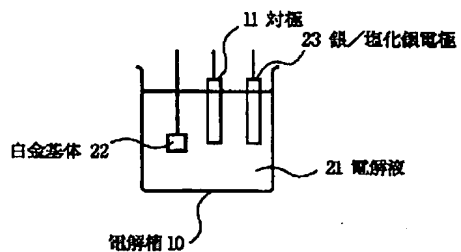
【図7】



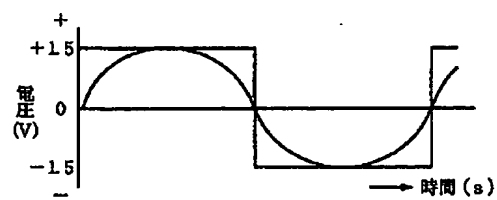
【図10】



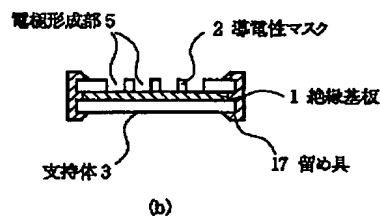
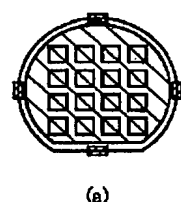
【図12】



【図6】



【図9】



【図11】

